

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification<sup>4</sup> :</b> A61K 49/00, 39/00, C07K 15/14 C12N 1/00	<b>A1</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 90/03801</b>  <b>(43) International Publication Date:</b> 19 April 1990 (19.04.90)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/US89/04513  <b>(22) International Filing Date:</b> 11 October 1989 (11.10.89)  <b>(30) Priority data:</b> 255,513      11 October 1988 (11.10.88)      US Not furnished      4 October 1989 (04.10.89)      US  <b>(71) Applicant:</b> UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA [US/US]; 3716 Hope Street, 200, Los Angeles, CA 90007-4344 (US).  <b>(72) Inventors:</b> EPSTEIN, Alan, L. ; 5128 Hillard Avenue, La Canada, CA 91011 (US). GLOVSKY, Michael, M. ; 750 Malcolm Avenue, Los Angeles, CA 90024 (US).  <b>(74) Agents:</b> SIMPSON, Andrew, H. et al.; Knobbe, Martens, Olson and Bear, 620 Newport Center Drive, 16th Floor, Newport Beach, CA 92660 (US).		<b>(81) Designated States:</b> AT (European patent), AU, BE (European patent), CH (European patent), DE (European patent), FR (European patent), GB (European patent), IT (European patent), JP, LU (European patent), NL (European patent), SE (European patent).  <b>Published</b> <i>With international search report.</i>
<b>(54) Title:</b> VASOPERMEABILITY-ENHANCING CONJUGATES  <b>(57) Abstract</b>  <p>Conjugates having a clinically useful delivery vehicle linked to a biologically active species which acts to increase vascular permeability and expand blood volume at or in proximity to the tumor site are disclosed. The vehicle-linked species may be, for example, a vasoactive agent, a substance that recruits or amplifies a vasoactive species, a toxin, a drug, an isotope, or a pharmaceutical compound. Suitable biological species comprises peptides, lipids, carbohydrates, or their derivatives. Chemical or recombinant DNA methods suitable for linking the species to the vehicles are indicated. A therapy is disclosed which comprises administering the vasoactive conjugate and delivering a diagnostic agent or a therapeutic agent at an optimal time thereafter, when tumor vasculature is maximally expanded.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-503347

第3部門第2区分

(43) 公表日 平成6年(1994)4月14日

(51) Int.Cl.<sup>8</sup>  
A 61 K 47/48

識別記号 庁内整理番号  
Z 7433-4C

F I

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平4-503177  
(86) (22) 出願日 平成3年(1991)12月13日  
(85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)6月21日  
(86) 国際出願番号 PCT/US91/09368  
(87) 国際公開番号 WO92/11037  
(87) 国際公開日 平成4年(1992)7月9日  
(31) 優先権主張番号 630, 017  
(32) 優先日 1990年12月19日  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), CA, JP, NO

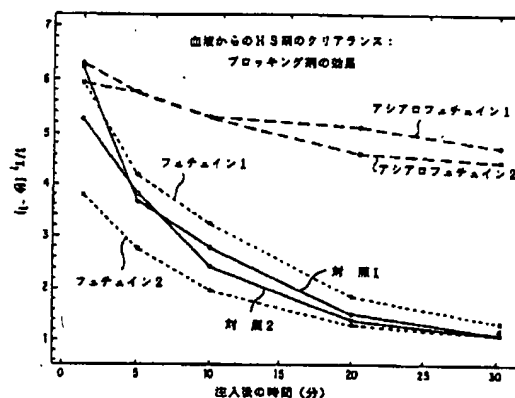
(71) 出願人 アドバンスド・マグネティクス・インク  
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州  
02138、ケンブリッジ、ムーニー・ストリート 61  
(72) 発明者 ジョセフソン、リー  
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州  
02174、アーリントン、チャーチル・アベニュー 14  
(72) 発明者 グロマン、アーネスト・バイ  
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州  
02135、ブルックリン、コロンビア・ストリート 80  
(74) 代理人 弁理士 山崎 行造 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多糖類を用いる治療薬のターゲティング

(57) 【要約】

本発明は、治療薬と、細胞受容体と相互作用することができる多糖類との間に複合体を生成し、インターナリゼーション (RME) により得られた複合体を細胞内に取り込む、治療薬を特定の細胞集団にターゲティングする方法に関する。本発明の1つの態様において、鉄を含む複合体と多糖類アラビノガラクタンの複合体を生成し、RMEにより鉄をとくに肝細胞にデリバリーするのに用いる。



## 請 求 の 範 囲

1. (i) 治療薬と、細胞受容体と相互作用できる多糖類との複合体を生成する工程及び  
(ii) その複合体をインターナライゼーションにより特定の細胞集団に取り込ませる工程を含む、特定の細胞集団に治療薬をターゲティングする方法。
2. 分解又は修飾の前に、多糖類は、1,000 ダルトンより大きい分子量を有する、請求項1に記載の方法。
3. 工程(1)が、  
(a) 第一の多糖類を得て、細胞受容体と相互作用できる第二の多糖類を構成する、第一の多糖類の修飾物質を生成する工程及び  
(b) 治療薬と第二の多糖類の複合体を生成する工程を含む、請求項1に記載の方法。
4. 工程(a)において、第一の多糖類の修飾物質を生成する工程が、細胞受容体と相互作用することができる第二の多糖類を構成する、第一の多糖類の分解生成物を生成する工程を含む、請求項3に記載の方法。
5. 多糖類が、アラビノガラクトン、マンナン及びブコイゲンから成る群から選ばれる、請求項1に記載の方法。
6. 治療薬が、鉄を含有する組成物を含み、多糖類がアラビノガラクトンである、請求項5に記載の方法。
7. 治療薬がメトトレキセートを含み、多糖類がアラビ

ノガラクトンである、請求項5に記載の方法。

8. 治療薬が薬酸を含み、多糖類がアラビノガラクトンである、請求項5に記載の方法。
9. 治療薬がスポンゴアデノシン (Ara A) 燐酸塩を含み、多糖類がアラビノガラクトンである、請求項5に記載の方法。
10. 治療薬が6 $\alpha$ -メチルプレドニゾロンを含み、多糖類がアラビノガラクトンである、請求項5に記載の方法。
11. 治療薬がトリフルオロチミジンを含み、多糖類がアラビノガラクトンである、請求項5に記載の方法。
12. 治療薬がホルモンを含む、請求項1に記載の方法。
13. ホルモンがコルチコステロイドである、請求項12に記載の方法。
14. ホルモンが6 $\alpha$ -メチルプレドニゾロンである、請求項12に記載の方法。
15. 治療薬が遺伝子を含む、請求項1に記載の方法。
16. 治療薬が酵素を含む、請求項1に記載の方法。
17. 治療薬がビタミンを含む、請求項1に記載の方法。
18. ビタミンが薬酸である、請求項1に記載の方法。
19. 治療薬がリボソームを含む、請求項1に記載の方法。
20. 多糖類がアラビノガラクトンである、請求項15に記載の方法。

## 明 細 書

多糖類を用いる治療薬のターゲティング

## 本発明の技術分野

本発明は、特異的な細胞集団、特に肝細胞に対して治療薬をターゲティングする方法に関する。

## 発明の背景

背景となる技術を振り返る前に、ある用語の意味を明確にすることが有用である。治療薬とは、受容体のある生理機能を、有利な方法で変化させる目的で投与されるものである。治療薬は薬物、タンパク質、ホルモン、酵素、核酸、ペプチド、ステロイド、成長因子、酵素活性物質の修飾物質、受容体活性物質の修飾物質およびビタミンを含む。診断薬とは、生理的機能には影響せず、ある生理的機能を明らかにする目的で投与されるものである。診断薬はシンチグラフィーのための放射性同位元素、X線またはコンピュータトモグラフィーのための高電子密度標識、および磁気共鳴画像のための磁気標識を含む。ターゲティング(targeting)とは、薬剤を修飾して、非経口投与の後に、ある特異的な種類または集団の細胞による取り込みが、未修飾の薬剤で得られる以上に増加するようにすることである。

インターナライゼーション(RME)とは、細胞外空間にある分子を、細胞表面の特異的な受容体に結合させて

細胞内に取り込む(internalize)作用である。RMEとして知られている方法を通して、血管内に注入(inject)された分子は、血漿から排除(除去)される。

RMEによる取り込みは一般に、リガンド-受容体相互作用に特有である3つの一般的な性質、すなわち構造特異性、飽和性および競合を示す。構造特異性は、受容体が密に関連した構造を識別できる時、また、受容体に結合する部位の、結合の必要条件に合う構造を有する分子のみが細胞に取り込まれる場合に観察される。RMEに関与する受容体はしばしば、血液循環から糖タンパク質を細胞内に取り込む又は排除する能力によって発見される。飽和性は、RMEを経て細胞内に取り込まれる薬剤の速度が、その薬剤の濃度の増加と共に減少する場合に観察される。これは高い濃度に於いて受容体がリガンドによってほぼ完全に占領されてきたか、もしくはリガンドで飽和されてきた結果生ずる。

競合は、薬剤の細胞内への取り込みの速度が、その薬剤に構造上の類似点を持っている付加的な薬剤の存在により減少する場合に観察される。付加した薬剤は、受容体の結合部位を競い、最初の薬剤の細胞内への取り込みの速度を減少させる。飽和性は、高濃度の単一のリガンドに限られた数の受容体部位を競う場合に結果として生じる。競合は、化学的に異なるリガンドに限られた数の受容体部位に結合する場合に結果として生ずる。

RMEによる物質の取り込みは、正常で健康な細胞の

特徴である。RME輸送系は、正常な大食細胞、肝細胞、繊維芽細胞および網状赤血球に見出される。RMEは細胞に、アシアロ糖タンパク質、低密度リポタンパク質、トランスフェリンおよびインシュリンのような血漿中の種々の高分子物質の細胞内取り込みを可能にする。RMEを行なう細胞の一覧としては、RMEの一般的な総説も含んでいる Wilemanらによる、232 Biochem. J. (1985) pp. 1-14 の表Iを参照のこと。1989年 8月 3日出願の Wenz, E. T. PCT 国際公開 (WO) 90/01295 の表Iも参照のこと。正常細胞の腫瘍細胞への転換(形質転換)は、RMEを行なう受容体の活性の増加または減少と関連しているようである。肝細胞の、アシアロ糖タンパク質の受容体によって行なわれるRMEのような場合には、がん化した肝細胞への形質転換は、受容体の減少を伴う [Stockertらによる、40. Cancer Res. (1980) pp. 3632-3634]。多くの場合には、腫瘍抗原に対する薬剤の、抗体に基づくターゲティングのように、抗原は腫瘍細胞上では増加し、正常細胞上では減少する。

アラビノガラクトクトンのような、RMEに関与する受容体と相互作用をする多糖類は、RME型多糖類と呼ばれる。デキストラン、デキストリン、セルロース、ヒドロキシエチル澱粉、ヘパリン、デンプン、デキストラン硫酸、カルボキシメチル化デキストランおよびカルボキシメチルセルロースのような多くの通常の多糖類は、RMEに関与する受容体と相互作用をせず、それらは非

飽される。リボソーム内の物質はそこで、RESを含む肝臓、脾臓および骨のような組織中に濃縮される。表面を修飾したリボソームが合成されており、RMEによって排除されるが、表面の修飾はタンパク質または糖タンパク質の被覆物から成る [Ranade, V. V. による 29. J. Clin. Pharmacol. (1989) pp. 685-694、Dragstenらによる 926 Biochem. Biophys. Acta (1987) pp. 270-279.]。

大きさおよび組成を異にするコロイドおよび粒子はRESにより認識される。例えば、貧血の治療のために用いられるデキストランで被覆したコロイド状酸化鉄であるインフェロン (Inferon) は、RESの大食細胞の食作用活性により、血液からゆっくりと排除される [Hendersonらによる、34 Blood (1989) pp. 357-375]。テクニシウム硫酸 (technetium sulfur) コロイドのような放射性診断薬およびMR用コントラスト剤として用いられる多くの種類の磁性粒子もまたRESによって排除される。議論の爲には、Josephsonらによる、8 Mag. Res. Imag. (1990) pp. 637-646参照のこと。

RMEにより細胞内に取り込まれる糖タンパク質は、治療薬をターゲティングする為に使われてきた。ターゲティング戦略の総説としては、Weijerらによる、6 Pharm. Res. (1989) pp. 105-118の表IIを参照のこと。発明の要約

本発明は、特定の細胞集団に、治療薬をターゲティン

RME多糖類と呼ばれる。

これらの定義を手元に、関連のある背景となる技術について論ずる。非RME型多糖類は、診断および治療薬として使用される種々の物質の合成に用いられてきた [Jacobsen, T. による欧州特許明細書 0186847、Schroderによる米国特許第 4,501,726号、Banney, D. F. による PCT国際公開 (WO) 90/03190 (1989年 9月 29日出願)、Gronanによる米国特許第 4,827,945号、Gronanによる米国特許第 4,770,183号]。Banneyは、腫瘍細胞に向けられた置換体担体を用いて、診断薬(磁気共鳴(MR)用コントラスト剤としての金属イオン)のデリバリーを開示している。Banneyは、他の治療用複合体も、この方法を用いて、化学治療の効果の為、または放射線治療の増感もしくは増強を与える為にデリバリーされることを、詳しい実施例なしに示唆した [Banney, D. F., PCT国際公開 (WO) 90/03190 (1989年 9月 29日出願)、p. 61]。RME型多糖類であるアラビノガラクトクトンは、ある種の診断薬、特に超常磁性酸化鉄をターゲティングする為に使用できることが知られている [Wenz, E. T. による PCT 国際公開 (WO) 90/01295 (1989年 8月 3日出願)]。

一方、治療薬は、一般的にリボソームおよび糖タンパク質によりターゲティングされてきた。一般的には注入の後、リボソームは微粒状物質として認識され、食作用を受け、その結果、細胞内皮系 (RES) 組織中に濃

縮する方法を提供する。ターゲティングは、治療薬と、インターナリゼーション (RME) を行なう受容体と相互作用することのできる多糖類との間に、複合体を形成することにより達成される。結果として生じる複合体は、次いで、インターナリゼーションにより特定の細胞集団に細胞内に取り込まれる。本発明は、治療薬が有益な作用を及ぼす組織では濃度が高くなり、望まれない毒性の影響を及ぼす組織では濃度が低くなることを可能にする。本発明の1つの態様においては、治療薬は、鉄およびアラビノガラクトクトンのような多糖類を含んでいる組成物を含む。この態様においては、アラビノガラクトクトンと鉄を含んでいる組成物との複合体を形成し、RMEにより、鉄を肝細胞へ特異的にデリバリーする為に使用する。

図の簡単な説明

本発明の前述の特徴は、添付した図に書かれている、以下の詳しい記述を参照することによって、より容易に理解される。

図1は、このデリバリーシステムのターゲティングの特異性を説明する為に、RME多糖類-治療薬複合体(本発明の態様による)のクリアランスに及ぼすアシアロフェクチンまたはフェクチンの効果の説明している図である。

特別な態様の詳細な説明

概略

本発明は、治療薬の、特定の細胞集団へのターゲティ

ングの方法を提供する。ターゲティングは、治療薬が何らかの有益な作用を及ぼす細胞集団に於いてはその薬剤の濃度を増大し、望まれない毒性の効果を生じる他の細胞に於いてはその濃度を減少させる。多くの治療薬は、その薬剤が有益な作用を及ぼす細胞に対してではなく、有益な作用を引き受ける細胞以外の細胞に、有害な効果をもたらす。

治療薬を、ある細胞へ近づけ、他の細胞から遠ざけるターゲティングにより、本発明は、以前開発された治療薬の安全性および効力を高める方法を提供する。たとえば、肝臓の肝細胞の代謝を修正すべく意図された治療薬は、骨髄細胞には有害な影響を及ぼす。骨髄の機能は生命にとって絶対必要なものであるが故に、骨髄に及ぼす有害な影響は使用可能な薬剤の量を制限する。もしその薬剤を、アラビノガラクトタンへの付着により肝細胞にターゲティングするなら、骨髄に対する濃度は減少する。通常は骨髄へ行く治療薬の小部分が、今度は肝臓に向けられるので、その薬剤の有効力は改良される。骨髄に関連した副作用は除去されるはずである。

本発明に用いられたRME型多糖類の識別

本発明では、治療薬をRME型多糖類に結合させ、結果としてできた複合体を、細胞表面の受容体の作用を通して特定の種類の細胞にターゲティングする。ある種の実験的多糖類のみを本発明に使用し、これらをRME型多糖類と呼ぶ。RME型多糖類は、たとえばデキストラン、デ

キストリン、セルロース、ヒドロキシエチル澱粉、ヘパリン、デンプン、デキストラン硫酸、カルボキシメチル化デキストリンおよびカルボキシメチルセルロースのような一般の非RME型多糖類とは異なる。非RME型多糖類は、薬剤のデリバリーや薬物製剤、食品添加物として、また血漿の増量のような種々の運用に利用する。RME型多糖類はアラビノガラクトタンおよびマンナンを含んでおり、本発明によれば、治療薬をそれぞれ直接に、肝細胞および大食細胞にデリバリーする為に使用する。前述のEasseyのような、多糖類を用いたある種の治療薬のデリバリーに関する文献は、RME型多糖類の使用については、開示もしくは関与していない。

以下、我々は本発明の複合体を、RME型多糖類-治療薬複合体と呼ぶ。RME型多糖類と治療薬との複合体は、治療薬のRME型多糖類への共有結合（実施例2および3）、多糖類で被覆したコロイド（実施例1）、またはRME型多糖類で被覆したリポソームを含む。

非RME型多糖類の、カルボキシメチル化、スクシニル化、ヒドロキシエチル化および硫酸化を含む、化学的修飾が行われてきた。一般に、通常の実験的多糖類の、かかる化学的修飾は、受容体に結合してRMEを受ける能力を与えない。

しかしながら、非RME型多糖類は、ある場合にはRMEを行なう受容体により認識される置換基の結合により修飾され、かかる修飾は、非RME型多糖類に

RME型多糖類の性質を与える。たとえば、ガラクトース残基を、非RME型多糖類であるデキストランに結合することができ、結果として生じた多糖類のガラクトースはアシアロ糖タンパク質受容体により認識されRMEを受ける。ガラクトースの結合により、デキストランはRME型多糖類に変えられる。同様に、マンノース基もデキストランに結合することができ、結果として生ずる多糖類は大食細胞のマンノース受容体により認識される。

RME型多糖類の第2の修飾は、部分的な消化を含み、より低分子量の多糖類を生じる。これは酸による調節された加水分解と、分別法により行なうことができ、希望する大きさの範囲のRME型多糖類を得ることができる。本発明の多糖類は、分解または修飾の前では、約1,000ダルトンより大きい分子量を有する。

多糖類を、RME型多糖類と呼ぶ為には、RMEを行なう受容体への多糖類の結合を示さなければならない。1つの証明の型は、RME型多糖類の、RMEによって排除されることが知られている糖タンパク質のクリアランスを妨げる能力を含む。たとえば、アラビノガラクトタンとアシアロ糖タンパク質受容体との相互作用は、アラビノガラクトタンが、アシアロ糖タンパク質であるアシアロフェクチンの放射性標本のクリアランスを妨げる能力により示された。ラットでは、500mg/kgのアラビノガラクトタンが、<sup>125</sup>I-アシアロフェクチンのクリアラ

ンスを妨げた [Josephson らによる、8 Neg. Res. Imag. (1990) pp. 637-646 表1参照のこと]。他の実験と同様、この実験の結果として、アラビノガラクトタンが肝細胞のアシアロ糖タンパク質受容体によって認識されることが結論される。従って、アラビノガラクトタンはRME型多糖類である。

同様にマンナンは、放射性糖タンパク質であるリボヌクレアーゼBのクリアランスを妨げる [Brown らによる、188 Arch. Biochem. Biophys. (1978) pp. 418-428]。アラビノガラクトタンおよびマンナンについては以下に簡単に論ずる。ここに明白に論じた多糖類に加えて、他のRME型多糖類も、論じた多糖類の修正或いは分解産物として生成することができる。

多糖類-治療薬複合体が、本発明に含まれる種類のものかどうかに関する簡単な検査は、種々の物質が、その複合体の血液からの除去（クリアランス）を遅らせる能力で説明することができる。本発明の複合体はRMEにより排除され、それらのクリアランスは、同じ受容体により排除される物質によって妨げられる。図1に見られるように、肝細胞上のRME受容体により排除されるアシアロフェクチンは、実施例1のアラビノガラクトタン酸化鉄コロイドのクリアランスを妨げる。アシアロフェクチンは、RMEを行なう受容体と相互作用をしない他の多くのコロイドまたは表面を被覆した粒子のクリアランスを妨げないであろう。

本発明の、RME型多糖類-治療複合体のクリアランスは、たとえばデキストランおよびヒドロキシエチル澱粉のような非RME型多糖類の実質的な濃度の注入によっても影響を受けない。本発明のRME型多糖類-治療複体のクリアランスはまた、RESの巨食細胞によって排除される、粒子、コロイドまたはリゾソームの実質的な濃度の注入によっても影響を受けない。

治療薬をデリバリーする担体としての多糖類の利点

治療薬のデリバリーに、タンパク質のかわりに多糖類を用いることの利点は、多糖類が高濃、極端なpH、または有機溶媒中において簡単に安定しないことである。実施例1において、多糖類、アラビノガラクトタンを酸化鉄コロイドの被覆剤として用いている。その合成過程において、アラビノガラクトタンはまず、可溶性の鉄の塩が存在している間は、およそ3より低いpHにさらされ、次いで塩基の添加以後は高いpHにさらされ、最後に高濃にさらされる。多糖類の安定性から、有機溶媒中で治療薬と多糖類との間に、共有結合ができたと考えられる。このことは、いくつかの治療薬が、低い水溶性を有するので、かなりの利点である。非水溶性の媒質中で作用する多糖類の、これに関連した利点は、エステルのような水に不安定な結合を治療薬と多糖類との間に作ることができることである。かかる化学作用の例は実施例3に供されている。

多糖類のもう一つの利点は、それらが微生物もしくは

植物材料から得られることである。ヒトまたは動物材料からの多糖類は、それが存在しないことを確かめるのに費用のかかる、抗原性を含んでいる可能性がある。微生物または植物材料からの多糖類は、本発明に用いるのに、毒性および免疫原性の非常に低いものを選ぶことができる。植物または微生物材料は、粗多糖類標本を、大量に、信頼できる方法で、手ごろな価格で提供することができる。本発明に使用できる2種類の炭水化物は、アラビノガラクトタンおよびマンナンである。

アラビノガラクトタン

アラビノガラクトタンは、多くの種類の木および植物の細胞壁から得られる、多糖類の一種である。アラビノガラクトタンの一般的な材料は、アメリカ西部のカラマツ [カラマツ属 オクシデンタリス (*Larix occidentalis*)] である。この材料からのアラビノガラクトタンは、食品の結合剤、乳化剤または安定剤として使用される。それはアラビノースおよびガラクトースの分枝鎖のある、ガラクトースの主鎖から成る。一般に、ガラクトース対アラビノースの比は5:1から10:1の間である。分子量は10から100キロダルトンの間である [Glickman編、"Food Hydrocolloids", CRC Press (1982) pp. 5, 33]。

最も良い結果は、精製したアラビノガラクトタンを用いた場合に得られる。市販のアラビノガラクトタンを、限外濾過によりさらに精製し、100,000 ダルトンより大きな

不純物および10,000ダルトンより小さな不純物を取り去ることができる。この方法により精製したアラビノガラクトタンを本発明の実施例に用いた。実施例1〜3で用いたアラビノガラクトタンはこの方法で精製したものである。

アラビノガラクトタンは、肝細胞のアシアロ糖タンパク質受容体に結合する。この受容体は種々の物質でRMEを行なう [Harford による、Vol. IV "The Glycoconjugates", M. I. Horowitz 編、Academic Press (1982) pp. 27-55]。アラビノガラクトタンに結合した治療薬は、肝細胞を標的とする。

マンナン

マンナンは、酵母菌の細胞壁から得られる多糖類の一種である。それらは主に、種々の直鎖および分枝鎖構造のある $\alpha$ -D-マンノピランである [Gorin による、Vol. 2 "The Polysaccharides", G.D. Aspinall 編、Academic Press (1983) pp. 376-380]。

マンナンはRESの巨食細胞に見出されるマンノース受容体に結合する。マンナンに結合した治療薬は、巨食細胞をターゲットとする。

本発明によりターゲティングされた治療薬

本発明の方法を用いることにより、広範な種類の治療薬を、ある細胞集団にターゲティングすることができる。かかる治療薬の例を表1にまとめた。表1のある薬剤は、肝炎の治療のための抗ウイルス剤のように、肝細胞にターゲティングされる。鉄は、栄養失調、すなわち鉄欠乏性

貧血を治療する為に、肝細胞にターゲティングされる。肝臓酵素の欠乏のような、遺伝的欠損が肝臓に発現している場合、DNAは肝臓にターゲティングされ、その遺伝的欠損を治癒する。本発明は、別の技法によりターゲティングされてきた治療薬をターゲティングする為に使用することができる。ターゲティングが試みられてきた治療薬の、別の一覧がある [Meijer による、6 Pharm. Res. (1989) pp. 105-118 表IIおよびRande, 29 J. Clin. Pharmacol. (1989) pp. 685-694参照]。

表I 本発明によりターゲティングされる薬剤および適用

薬剤	適用	参考
鉄	貧血の治療	実施例1
Ara A- リン酸塩	肝炎の治療	Bodner による 112 Methods in Enzymology (1985) pp. 298-306
トリフルオロ チミジン	肝炎の治療	同上
DNA	遺伝的欠損の 取り消し	Yu による、263 J. Biol. Chem. (1988) pp. 14621-14624
メトトレ キセート	リーシュマニ ア症の治療	Mukhopadhyay による、 244 Sci. (1989) pp. 705-707

B型肝炎ウイルスに慢性的に感染している個体の肝細胞に対する抗ウイルス剤のターゲティングは、抗ウイルス剤が、ターゲティングされる治療薬であるという点で本発明の適用の1つである。抗ウイルス剤を、感染した細胞集団(肝細胞)にターゲティングし、骨髄から遠ざけることは、結果として薬物による、より効果的な治療を生じるであろう。抗ウイルス物質をアラビノガラクトタンに結合し、静脈内に注射して、肝細胞中の濃度を高めることができる。鉄のような、栄養的に必要とされる物質のターゲティングは本発明によって行なうことができる。実施例1においては、本発明の教示に従って、RMEにより鉄をターゲットに向けるアラビノガラクトタンコロイドを合成する。非経口的に投与した鉄はインフェロン(Interferon)と呼ばれる、酸化鉄デキストラン複合体の形で、しばしば貧血の治療に用いてきた。酸化鉄デキストランは、RESにより血液から徐々に排除される。Interferonは、不利な反応を引き起こす傾向を示す[Bassatraらによる、243 JAMA (1980) pp. 1726-1731]。対照的に、アラビノガラクトタンとともに作った酸化鉄(実施例1参照)は、RMEによりすみやかに排除され、肝臓の肝細胞にターゲティングされる。薬物動態学および生体内分布におけるこの差異は、本発明の鉄が、酸化鉄デキストランよりも安全な治療薬であるという点に帰着するであろう。

ビタミンも本発明によりターゲットに向けることがで

きる。実施例2は、葉酸-アラビノガラクトタン複合体の調製を示しており、それはRMEによりビタミンである葉酸を肝細胞にターゲティングする。葉酸は薬物であるメトトレキサートと化学的には類似しており、メトトレキサートは、葉酸用に示された方法をわずかに変更することによりアラビノガラクトタンに結合することができる。

ステロイドのようなホルモンは、本発明の方法を利用することにより、特異的な細胞集団へ、直接デリバリーすることができる。ステロイドは、強い生物活性を有し、それはステロイドが細胞上の受容体に結合した後に働く[Martin, C. R., "Textbook of Endocrine Physiology", Williams & Wilkins (1978) p. 21 参照]。ステロイドの、細胞へのターゲティングは、本発明の広範囲に有用な適用の1つである。ホルモンのターゲティングの1つの適用は、グルココルチコイドであるステロイドの、細胞へのターゲティングを含む。実施例3はアラビノガラクトタン-プレドニゾン結合体の合成を示しており、その結合体は、ステロイドであるプレドニゾンをRMEにより肝細胞へターゲティングするのに役立つ。ステロイドはマンナンへの結合によってもターゲティングすることができ、RESの細胞上に存在するマンノース受容体によって、適切な細胞内へターゲティングされる。

#### 実施例

##### 実施例1

アラビノガラクトタンで被覆したコロイド酸化鉄を、鉄欠乏症の治療用に調製した。国際公開(VO) 90/01295の実施例6.10.1と同様、アラビノガラクトタンで被覆した超常磁性(または常磁性)酸化鉄を調製した。 $\text{FeCl}_3$  (15.8g、58.5mmol)および $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (6.24g、31.6mmol)の水溶液を調製し、0.22 $\mu$ のフィルターで濾過し、大きな碎片を除去した。等量の、鉄塩と、カラマツ材由来のアラビノガラクトタン(60g、Sigma Chemical Co.)を蒸留水120mLに溶かした水溶液とを合わせ、周囲温度で激しく攪拌した。この混合物に水酸化アンモニウムの30%水溶液を、pHが約10になるまでゆっくり滴下した。次に混合物を約90~100℃でおよそ15分間加熱した。混合物を冷却し、フィルターの多孔度を0.80、0.45、0.22 $\mu$ と小さくしながら濾過した。

次いで300キロダルトンで分離(cut off)する、2Lの中空糸ユニット(Amicon, Inc., Danvers、マサチューセッツ州)を用いた限外濾過処理により、過剰のアラビノガラクトタンを除去する。前述の処理で得た濾過産物を限外濾過ユニットに装填し、25mMクエン酸ナトリウム緩衝液(pH8.5)を加えて洗浄する。洗浄は5回繰り返すか、または澄んだ溶液が観測されるまで洗浄する。洗浄した産物を濃縮し、多糖類と金属溶液を合わせたものと同様の体積に調製する。

多糖類であるアラビノガラクトタンを、鉄コロイドの被覆剤として使用している為、それは肝細胞のアシアロ糖

タンパク質受容体によって排除される。注入した鉄が肝臓に存在し、脾臓には存在しないことは、特異的な細胞集団(肝細胞)への鉄のターゲティングが行なわれたことを示している。データは、Josephsonらによる、8 Mag. Res. Imag. (1990) pp. 637-646の表2、またはKenzらによるPCT国際公開(VO) 90/01295、表Vを参照のこと。

アラビノガラクトタンで被覆した酸化鉄の、治療のポテンシャルは、合成に $^{59}\text{Fe}$ を用いた場合に示すことができる。鉄はヘモグロビン中に検出される鉄のように、正常な生体の鉄のプールに、寿命中取り込まれている。従って、アラビノガラクトタン型の酸化鉄は、鉄欠乏性貧血の処置に用いた場合に治療薬となり得る。

##### 実施例2

葉酸は、ビタミンの一種で、以下に述べるように、アラビノガラクトタンと呼ばれるRMEを受ける多糖類に結合されてきた。メトトレキサートという薬物は、葉酸の拮抗体であり、抗がん剤である。メトトレキサートは、以下に示す葉酸のカップリング化学作用の修正により、RMEを受ける多糖類に結合させ、薬物デリバリーに利用することができる。

葉酸二水和物(6.0mg、13 $\mu$ mol)を $\text{H}_2\text{O}$  (1mL)に懸濁する。 $\text{NaOH}$  (0.01N、7滴)を、白い固体の葉酸が、ほぼ完全に溶けるまで加える。精製したアラビノガラクトタン(23,000ダルトン、35.3mg、1.53 $\mu$ mol)を加

え、次いで1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド (51.2mg, 288  $\mu\text{mol}$ ) を加える。室温で2.5時間攪拌した後、反応混合物をSephadex G-25 カラム (9.5  $\times$  300mm) で0.05%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.33mL/分) を溶離剤として用いたHPLCにより分析した。遊離の薬酸および結合した薬酸の検出は、280nm にセットしたUV検出器を用いて行なった (薬酸のUVmaxは283nmであり、logは4.40である)。クロマトグラムは、保持時間16.8分のところにアラビノガラクトサンに結合した薬酸塩によるピークを示した。遊離の薬酸は35分に見られた。これらの割り当ては、アラビノガラクトサンおよび薬酸をクロマトグラフィにかけて得たものである。精製したアラビノガラクトサンは、280nmでは吸収しない為、屈折率測定器を必要とする。UV検出によれば、37%の薬酸がアラビノガラクトサンに結合した。アラビノガラクトサンの減価がなく、37%の薬酸塩が結合したことから、薬酸/アラビノガラクトサン比3:1を得た。

### 実施例3

ステロイドは、RMEを受ける多糖類に結合することによって細胞にデリバリーすることのできる薬物の一種である。いろいろなステロイドを、以下に述べるものと類似の化学作用に従って、それらの多糖類に結合させることができる。一般的な工程は、(i)DTPA との反応による、カルボキシル基を提供する多糖類結合体の調製と、(ii)ステロイドの、DTPA-多糖類のカルボキシル基を介

する結合である。

### アラビノガラクトサン-DTPAの調製

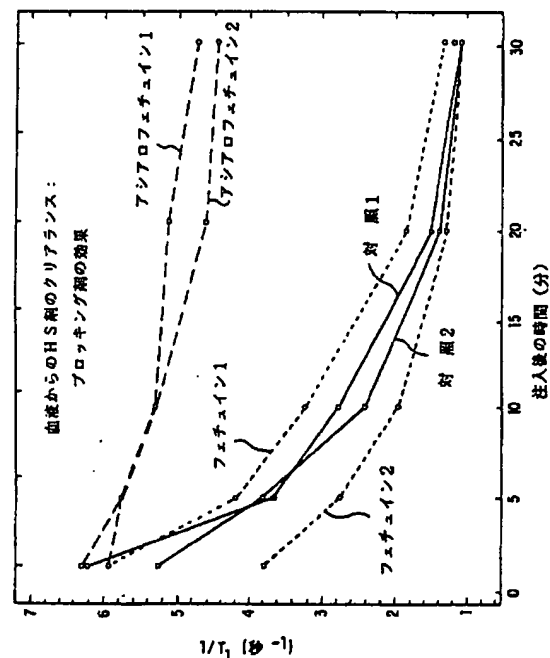
精製したアラビノガラクトサン (23,000ダルトン、0.50g、21.7  $\mu\text{mol}$ ) およびジエチレントリアミンペンタ酢酸 (DTPA)、ジアンヒドリド (0.102g、285  $\mu\text{mol}$ ) を、DMSO (20mL) に、80℃で溶解した。1時間後、澄んだ溶液を室温に冷やした。 $\text{H}_2\text{O}$  (10mL) の添加により、白い沈殿を生じた。混合物をAmicon YM 5 限外濾過膜 (分画5,000ダルトン) で濾過し、 $\text{H}_2\text{O}$  (4  $\times$  30mL) で洗った。膜の上に残った生成物を  $\text{H}_2\text{O}$  (10mL) に溶かし、凍結乾燥した。白い粉末の収量は0.44gであった。加えたDTPA (呼称の式量は28,000ダルトン) のすべてが結合したとすれば、呼称のDTPA/アラビノガラクトサン比は13:1であった。

### 6 $\alpha$ -メチルプレドニゾロンのアラビノガラクトサン-DTPAへのカップリング

アラビノガラクトサン-DTPA (107.5mg、3.8  $\mu\text{mol}$ ) と、6  $\alpha$ -メチルプレドニゾン (84.5mg 172  $\mu\text{mol}$ ) を、DMSO (15mL) に80℃で溶かした。1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド (259mg、1.45mmol) を加え、反応混合物を80℃で1時間攪拌した。反応液のHPLC分析 (9.5  $\times$  300mm のセファデックス G-10 カラム、溶離剤は0.05%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、0.50mL/分、280nm UV検出器) は、アラビノガラクトサン-DTPA結合体の移動度に相当する、保持時間10.5分のところに単一

のピークを示した。19.5分のところには、6  $\alpha$ -メチルプレドニゾロンのピークはなく、アラビノガラクトサン-DTPA結合体へのステロイドの結合 (エステル化による) が完全であったことを示している。 $\text{H}_2\text{O}$  (10mL) を加えた後、反応混合物をAmicon YM 3 (分画3,000ダルトン) を用いて限外濾過し、 $\text{H}_2\text{O}$  (3  $\times$  30mL) で洗浄した。濾液には未反応のステロイド、カルボジイミド、DTPAの痕跡および他の低分子量物質が含まれていた。濾液のHPLC分析により、遊離のステロイドがないことを確認した。保持されていた物質に  $\text{H}_2\text{O}$  (10mL) を加え、生成物を凍結乾燥した。オフホワイトの粉末の収量は0.10gであった。

FIG. 1



国際調査報告

International Application No. PCT/US 91/09368

**1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER** of national character in (symbol code, subclass etc.)  
 according to International Patent Classification (IPC) or to Sub-Regional Classification and IPC  
 Int. Cl. 5 A 61 K 47/48

**2. FIELD SEARCHED**  
 National Documentation Number:  
 Classification System: Classification Evidence:  
 Int. Cl. 5 A 61 K

**3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant paragraph	Reference to Class No.
Y	WO-A-9001295 (ADVANCED MAGNETICS INC.) 22 February 1990, see page 8, line 31 - page 25, line 32 (cited in the application)	1-9, 11, 15-20
Y	Magnetic Resonance Imaging, vol. 8, no. 5, 1990, (Elmsford, NY, US), L. JOSEPHSON et al.: "A functionalized superparamagnetic iron oxide colloid as a receptor directed MR contrast agent", pages 637-646, see whole article, and in particular page 644, last paragraph - page 645, paragraph 1 (cited in the application)	1-9, 11, 15-20
Y	J. American Medical Association, vol. 243, no. 37, 2 May 1980, (Chicago, IL, US), R.D. HARTMAN et al.: "Intravenous iron dextran in clinical medicine", pages 1725-1731, see page 1726, abstract (cited in the application)	1-6

**4. CATEGORIZATION**

Date of the latest completion of the International Search: 16-04-1992  
 Date of holding of the International Search Report: 03 JUN 1992

International Searching Authority: EUROPEAN PATENT OFFICE  
 Signature of Authorizing Officer: *[Signature]*  
 Name: M. KUIPER

International Application No. PCT/US 91/09368

**5. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT** (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category	Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant paragraph	Reference to Class No.
Y	Science, vol. 244, 12 May 1989, (Washington, DC, US), A. MUDHOPADHYAY et al.: "Receptor-mediated drug delivery to macrophages in chemotherapy of Leishmaniasis", pages 705-707, see page 705, abstract (cited in the application)	1-5, 7
Y	Pharmaceutical Research, vol. 6, no. 2, 1989, (Stuttgart, DE), O.K.F. MEIJER et al.: "Covalent and noncovalent protein binding of drugs: Implications for hepatic clearance, storage, and cell-specific drug delivery", pages 105-118, see page 105, abstract; page 113, table 11 (cited in the application)	1-5, 9, 11, 15-18, 20
Y	The Journal of Biological Chemistry, vol. 263, no. 29, 15 October 1988, (Baltimore, US), G.Y. WU et al.: "Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo", pages 14621-14624, see page 14621, abstract (cited in the application)	1-5, 15, 20
Y	Carbohydrate Research, vol. 118, 1983, (Amsterdam, NL), M.M. POWIPOM et al.: "Synthesis of 6-(5-cholatan-2beta-yl)-1-thio-beta-D-glucopyranoside and derivatives thereof for in vivo liposome studies", pages 47-55, see page 47, paragraph 1 - page 48, paragraph 1	1-5, 19
Y	Biochemistry International, vol. 10, no. 3, March 1985, (North Ryde, AU), P. DASGUPTA et al.: "Receptor-mediated uptake of asialoganglioside liposomes: Sub-cellular distribution on the liposomal marker in isolated liver cell types", pages 327-328, see page 327, summary	1-5, 19
Y	Proc. Indian. Natn. Sci. Acad., vol. 48, supplement no. 1, 1982, (New Delhi, IN), P. GHOSH et al.: "An approach to tissue targeting of drug and proteins using liposomes", pages 12-19, see page 12, abstract	1-5, 19
Y	Methods in Enzymology, vol. 112, 1985, (New York, US), J.L. BOOKER et al.: "[23] Carrier potential of glycoproteins", pages 298-305, see page 298, paragraph 2; page 302, paragraph 2 (cited in the application)	1-5, 9, 11
A	EP-A-0281809 (AMERICAN CYANAMID CO.) 14 September 1989, see page 2, lines 16-18, 32-50	

国際調査報告

International Application No. PCT/US 91/09368

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET**

**V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE**  
 The International Search Report did not contain observations in respect of certain claims under Article 17(2)(b) for the following reasons:  
 1. ☒ Claims are obvious.  
 2. ☐ Claims are not novel.  
 3. ☐ Claims are not supported by the description.  
 4. ☐ Claims are not supported by the claims.  
 5. ☐ Claims are not supported by the claims.  
 6. ☐ Claims are not supported by the claims.  
 7. ☐ Claims are not supported by the claims.  
 8. ☐ Claims are not supported by the claims.  
 9. ☐ Claims are not supported by the claims.  
 10. ☐ Claims are not supported by the claims.

**VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**  
 The International Searching Authority found multiple inventions in this International Application as follows:  
 1. ☐ As an inventive technical claim was incorporated by the applicant, the International Search Report reports of non-inventive character of the International Application.  
 2. ☐ As an inventive technical claim was incorporated by the applicant, the International Search Report reports of non-inventive character of the International Application for the reasons set forth in the International Search Report.  
 3. ☐ The International Searching Authority found multiple inventions in this International Application as follows:  
 4. ☐ As an inventive technical claim was incorporated by the applicant, the International Searching Authority reports of non-inventive character of the International Application.  
 5. ☐ As an inventive technical claim was incorporated by the applicant, the International Searching Authority reports of non-inventive character of the International Application.  
 6. ☐ As an inventive technical claim was incorporated by the applicant, the International Searching Authority reports of non-inventive character of the International Application.  
 7. ☐ As an inventive technical claim was incorporated by the applicant, the International Searching Authority reports of non-inventive character of the International Application.  
 8. ☐ As an inventive technical claim was incorporated by the applicant, the International Searching Authority reports of non-inventive character of the International Application.  
 9. ☐ As an inventive technical claim was incorporated by the applicant, the International Searching Authority reports of non-inventive character of the International Application.  
 10. ☐ As an inventive technical claim was incorporated by the applicant, the International Searching Authority reports of non-inventive character of the International Application.

国際調査報告

US 9109368  
SA 55503

The search has been completed in accordance with the provisions of the International Patent Cooperation Treaty (PCT) and the results are set forth in the International Search Report (ISR) and the International Preliminary Report on Patentability (IPRP) which are hereby submitted to the applicant for his/her information.

Foreign document cited in search report	Publication date	Foreign document cited in search report	Publication date
WO-A-9001295	22-02-90	EP-A-0381742	16-08-90
		JP-T-4501218	05-03-92
EP-A-0281809	14-09-88	US-A-4857585	15-08-89
		AU-B-603189	08-11-90
		AU-A-1277688	08-09-88
		JP-A-63253030	20-10-88
		ZA-A-6801657	06-09-88

For more details about this search, see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/92

フロントページの続き

(72)発明者 ジャン、チュー  
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州  
02174、アーリントン、クーリッジ・ロー  
ド 21

(72)発明者 ルイス、ジェローム・エム  
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州  
02161、ニュートン、アブランド・アベニ  
ュー 273

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成10年(1998)8月18日

【公表番号】特表平6-503347

【公表日】平成6年(1994)4月14日

【年通号数】

【出願番号】特願平4-503177

【国際特許分類第6版】

A61K 47/48

【F I】

A61K 47/48 Z

## 手続補正書

平成10年 2月17日

特許庁長官 殿

## 1 事件の表示

平成4年特許第503177号

## 2 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 アドバンスド・マグネティクス・インタ

## 3 代理人

住 所 東京都千代田区永田町1丁目1番28号  
納品永田町ビルディング 8階

電話 3581-9671

氏 名 (7101) 井理士 山 渡 行 造

司 所

氏 名 (7603) 井理士 木 村 博

## 4 指図書送附の日付

平成 年 月 日(発送日)

## 5 補正対象書類名

明細書及び請求の範囲。

## 6 補正対象項目名

明細書及び請求の範囲。

## 7 補正の内容

明細書のとおり。

1. 明細書、6頁2行、5行「インターナリゼーション」を「インターナリゼーション」に訂正する。
2. 同、同頁5乃至6行「特定の細胞集団に細胞内に」を「細胞の特定の細胞集団に」に訂正する。
3. 同、同頁9乃至11行「治療薬は、…を含む。」を「治療薬は糖を含む組成物を含有、多糖類はアラビノガラクトサンであり得る。」に訂正する。
4. 同、同頁13行「使用する。」を「使用される。」に訂正する。
5. 同、8頁11行、11行「デリバリー」を「デリバリー」に訂正する。
6. 同、13頁下から6行「ターゲティングされた」を「ターゲティングされる」に訂正する。
7. 同、15頁11行「Inferon」を「インフェロン」に訂正する。
8. 同、18頁15行「ビタミン」を「ビタミン」に訂正する。
9. 同、19頁16行「糖鎖」を「糖鎖」に訂正する。
10. 同、20頁下から4行「反応液」を「反応液混合物」に訂正する。
11. 同、請求の範囲を以下の通り訂正する。
  1. (i) 治療薬と、細胞受容体と相互作用できる多糖類との複合体を生成する工程及び
    - (i) その複合体をインターナリゼーションにより特定の細胞集団に取り込ませる工程を含む、特定の細胞集団に治療薬をターゲティングする方法。
  2. 分解又は修飾の前に、多糖類は、1,000 ダルトンより大きい分子量を有する、請求項1に記載の方法。
  3. 工程(i) が、
    - (a) 第一の多糖類を得て、細胞受容体と相互作用できる第二の多糖類を構成する、第一の多糖類の修飾物質を生成する工程及び
    - (b) 治療薬と第二の多糖類の複合体を生成する工程を含む、請求項1に記載の方法。
  4. 工程(a) において、第一の多糖類の修飾物質を生成する工程が、細胞受容体と相互作用することができる第二の多糖類を構成する、第一の多糖類の分

- 解生成物を生成する工程を含む、請求項3に記載の方法。
5. 多糖類が、アラビノガラクトン、マンナン及びフコイダンから成る群から選ばれる、請求項1に記載の方法。
  6. 治療薬が、鉄を含有する組成物を含み、多糖類がアラビノガラクトンである、請求項5に記載の方法。
  7. 治療薬がメトトレキサートを含み、多糖類がアラビノガラクトンである、請求項5に記載の方法。
  8. 治療薬が尿酸を含み、多糖類がアラビノガラクトンである、請求項5に記載の方法。
  9. 治療薬がスポンゴアデノシン (Ara A) 糖酸塩を含み、多糖類がアラビノガラクトンである、請求項5に記載の方法。
  10. 治療薬が $\alpha$ -メチルゾレドニゾロンを含み、多糖類がアラビノガラクトンである、請求項5に記載の方法。
  11. 治療薬がトリフルオロチミジンを含み、多糖類がアラビノガラクトンである、請求項5に記載の方法。
  12. 治療薬がホルモンを含む、請求項1に記載の方法。
  13. ホルモンがコルチコステロイドである、請求項12に記載の方法。
  14. ホルモンが $\alpha$ -メチルゾレドニゾロンである、請求項12に記載の方法。
  15. 治療薬が遺伝子を含む、請求項1に記載の方法。
  16. 治療薬が酵素を含む、請求項1に記載の方法。
  17. 治療薬がビタミンを含む、請求項1に記載の方法。
  18. ビタミンが脂溶性である、請求項17に記載の方法。
  19. 治療薬がリポソームを含む、請求項1に記載の方法。
  20. 多糖類がアラビノガラクトンである、請求項18に記載の方法。」